

베체트병의 동물모형에 대한 瀉心湯類 투여 효과에 관한 연구

이선구* · 안규석¹

상지대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 경희대학교 한의과대학 병리학교실

Experimental Studies on the Kinds of Sasim-tang in Behçet's Disease Symptoms in ICR Mice

Seon Goo Lee*, Kyoo Seok Ahn¹

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Sangji University
1: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

Chronic oral aphthae, recurrent ulcer and uveitis are the three main festations of Behçet's disease(BD). The aetiopathogenesis of Behçet's disease is still obscure, but herpes simplex virus is one of the possible casual factors. Gamchosasim-tang(Gancaoxiexin-tang), Banhasasim-tang(Banxiaxiexin-tang) and Saenggangsasim-tang(Shengjiangxiexin-tang) are traditional medication in Oriental medicine, that has been used to treat inflammatory disease. Especially, Gamchosasim-tang used to treat Behçet's disease like symptoms. ICR mice were used for this study. The earlobe of the mice were scratched with a needle, then inoculation with 1.0 X 10⁶ plaque forming units/ml of HSV type 1. Virus inoculation was performed twice with 10 day interval, followed by 16 weeks fo observation. Using the HSV-induced Behçet's disease mouse model, kinds of Sasim-tang were administered variously before and after inoculation. In order to classify the symptomatic mice as having Behçet's disease like symptoms. We followed the revised Japanese classification with minor modifications. Ulceration of the mice were monitored. In addition, spleen cytokine expression were measured by polymerase chain reaction, ELISA. HSV DNA was detected in HSV inoculation mice. HSV-induced mice treated with kinds of Sasim-tang showed improvement in symptom. In RT-PCR results, IFN-γ was expressed for all groups, IL-2 was expressed for the treated groups, and IL-10 was also expressed. IL-4 was expressed nothing. In ELISA, IL-2 was increased for GSST 2, BSST 2, GSST 2, GSST3 and INF-γ was increased for GSST 2, BSST 2, SSST 2, SSST 3. This model suggest the possible role of immune response to viral infection in the development and activation of Behçet's disease.

Key words : Behçet's disease, Gamchosasim-tang(甘草瀉心湯, Gancaoxiexin-tang), Banhasasim-tang(半夏瀉心湯, Banxiaxiexin-tang), Saenggangsasim-tang(生薑瀉心湯, Shengjiangxiexin-tang), Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-5, Interferon-γ

서론

베체트병(Behçet's disease)은 재발성 구강 및 외음부 궤양, 안질환을 주증상으로 하는 질환으로 1937년에 Hulusi Behçet¹⁾이 처음 기술하였다. 병변의 진행상태에 따라 失明이나 腸穿孔 같은 심각한 합병증을 유발하는 질환이나 확실한 병인과 정확한 진단법이 알려져 있지 않아 주로 임상소견으로 설정한 진단기준을 사

용하고 있으며²⁾, 질병의 진행상태를 파악할 수 있는 검사방법이 없어 치료에 대한 반응을 객관적으로 측정하는데도 한계가 있다. 베체트병의 원인으로서는 바이러스에 의한 발병설, 연쇄상 구균의 항원에 의한 알레르기설, 有機磷劑나 殺蟲劑에 의한 중금속 중독설 및 유전학적 관련설이 보고된 바 있다³⁾.

지리적으로 지중해연안 및 동아시아에 높은 발생빈도⁴⁾를 보이며, 우리나라, 일본, 중국등에서 비교적 호발⁵⁾하며 소아보다 성인, 남성보다 여성에게 빈발하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 베체트병에 대하여 한의학적으로 병증 및 개념이 정확히 일치하는 것은 없으나, '孤惑'⁷⁾, '蠱惑'⁸⁾, '濕蘞病'⁹⁾의 병증과 유사하다. 특히 金匱

* 교신저자 : 이선구, 강원도 원주시 우산동 660번지 상지대학 한의과대학
· E-mail : returnto@sangji.ac.kr, · Tel : 033-730-0664
· 접수 : 2004/05/13 · 수정 : 2004/06/16 · 채택 : 2004/07/20

要略에서 제시한 ‘孤惑’은 그 증상의 묘사가 베체트병과 매우 유사한 것으로 볼 수 있는데, 金匱要略 및 역대의 주가들은 ‘孤惑’의 대표적인 치료 처방으로 甘草瀉心湯을 들고 있지만, 실제 임상적으로 베체트병에 사용되는 처방으로써 養血滋陰이나 清熱解毒을 위주로 하고 있다.

베체트병의 원인 진단 및 치료제 개발을 위한 동물모형으로 Sohn¹⁰⁾ 등의 방법에 의한 HSV(Herpes Simplex Virus)를 이용한 동물모형이 있는데, 이 경우 베체트병의 치료 효과 유무를 판단하는 기준은 대체로 임상 증상의 호전 정도와 면역반응의 변화를 측정하고 있다.

이에 저자는 베체트병 동물모형에 金匱要略에서 제시한 甘草瀉心湯과 半夏瀉心湯, 生薑瀉心湯을 투여하여 증상 개선 유무를 관찰하였다. 또한 면역 반응의 변화를 알아보기 위하여 Interleukin-2(IL-2), Interleukin-4(IL-4), Interleukin-10(IL-10), Interferon- γ (IFN- γ),를 RT-PCR(Reverse Transcription-polymerase chain reaction), ELISA assay(enzyme-linked immunosorbent assay)를 시행하여 다음과 같은 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 베체트병의 유발

1) 실험동물

생후 5주령, 체중 20g내외의 음성 ICR 마우스(대한바이오링크, 한국)를 구입하여 사료(삼양사료(주), 한국)와 수돗물을 자유롭게 급식시키면서, 온도 21±2℃, 습도 55±3%의 항온습기(명진기계, 한국)에서 1주일간 적응 시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 베체트병 유발 바이러스

(1) 바이러스

베체트병을 유발하는 바이러스는 Herpes Simplex Virus(HSV) type I 을 사용하였으며, 아주대학교 의과대학(세포생물학 실험실, 손성향 교수)에서 냉동상태로 분양받아 Vero 세포를 숙주로 하여 배양하였다.

(2) 배지

바이러스를 배양하기 위하여 사용한 기본배지는 증류수 1L 에 RPMI 1640(Gibco, USA) 16.2g에 3.7g sodium bicarbonate (Shinyopure Chemicals Co, Japan), Penicillin G (100,000 Units/ml, Sigma, USA) 1ml, Streptomycin (100 mg/ml, Sigma, USA) 1 ml, fungizone (Gibco, USA) 4ml을 첨가하여 혼합한 뒤, bottle top filter (Corning, USA)로 멸균 여과하여 사용하였고, fetal bovine serum (FBS ;Gibco, USA)는 56℃의 항온수조에서 30분간 불활성 시킨 후 기본배지에 10% 첨가하여 혼합배지로 사용하였으며, 세포 배양 전반에 사용하였다.

(3) 바이러스 배양 세포주

HSV 바이러스의 배양 숙주로 Vero (KCLB 10081, 한국세포주은행) 세포를 사용하였다. Vero 세포는 한국세포주은행으로부터 분양받아 5% CO₂와 95% air의 배양기(존샘, 한국)에서 37℃를 유지하며 배양하였다. 배양된 세포는 매일 위상차 현미경 (HUND, Germany)을 통하여 관찰하고 주 1-3회의 계대배양을

하면서 적정하게 성장시켜 사용하였다.

(4) Vero 세포주에 HSV 바이러스 감염 유발

지수 증식기의 Vero세포에 분양 받은 HSV를 접종하여 매일 위상차 현미경으로 감염 여부를 확인하였고, 1.0 × 10⁶ plaque-forming units(pfu)/ml의 농도로 자랐을 때, 상층액을 수거하여 실험에 사용하였다.

3) 베체트병의 유발

Vero 세포에 접종하여 HSV를 배양한 후 1.0 × 10⁶ plaque-forming units(pfu)/ml로 조정된 후 ICR 마우스의 귀이개(earlobe)에 needle로 상처를 낸 후 0.2ml씩 접종하였다. 마우스는 럽퐁(Rompun, BAYER) : 케타민(Ketamine, 유한양행) = 2:3의 비율로 혼합 후 0.01ml씩 근육주사하여 마취 후 실시하였다. 접종은 7일 간격으로 2회 실시하였다.

2. 검액의 제조 및 투여

투여처방은 甘草瀉心湯(Gamchosasim-tang, Gancaoxiexin-tang, GSST), 半夏瀉心湯(Banhasasim-tang, Banxiexin-tang, BSST), 生薑瀉心湯(Saenggangsasim-tang, Shengjiangxiexin-tang, SSST)을 사용하였고 한 첩 분량은 체¹¹⁾의 용량을 근거로 하였으며(Table I, Table II, Table III), 감초사심탕의 경우 금계요락에 근거하여 인삼을 첨가하였다. 검액의 제조는 각 처방 10첩 분량을 5,000ml의 둥근 플라스크에 3,000ml의 증류수와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 3시간 동안 진탕한 후, 여과한 여액을 rotary vaccum evaporator(Yamato, Japan)에서 감압농축하였다. 농축액을 동결건조기(일신Engineering, 한국)로 동결 건조하여 감초사심탕129.43g (수득율 15.7%), 반하사심탕 103.34g (수득율 18.5%), 생강사심탕 81.44g (수득율 9.6%)의 분말을 수거한 후, 필요한 농도로 조정하여 실험에 사용하였다. 얻어진 건조액기는 성인 1일 분량으로 환산하여 감초사심탕은 32.4mg/ml, 반하사심탕은 25.8mg/ml, 생강사심탕은 20.4mg/ml의 농도로 맞춘 후 실험당일 각각 0.2ml씩 경구투여 하였으며, 사용된 검액은 사용 전에 매번 확인 하여 부유물이나 침전물이 있는 경우 다시 제조하여 사용하였다.

3. 실험군의 구분

실험군은 사심탕 투여가 HSV 감염에 의한 베체트병의 유발 및 증상 호전에 어떻게 관여하는지 알아보기 위하여 Sohn 등¹²⁾의 실험을 참고하여 다음과 같이 나누었다(Fig. 1). HSV의 접종은 10일 간격으로 2회 실시하였다. 실험 전체에 대한 대조군으로 바이러스만을 접종하여 HSV감염을 유도한 control군을 사용하였다. HSV 감염 없이 사심탕 자체의 대조군으로 감초사심탕만을 처리한 GSST 1군, 반하사심탕만을 처리한 BSST 1군, 생강사심탕만을 처리한 SSST 1군을 두었다. 사심탕류가 HSV 감염 전에 작용하는지 알아보려고 HSV 접종 전에 사심탕을 각각 투여하여 하였는데, 감초사심탕을 처리한 GSST 2군, 반하사심탕을 처리한 BSST 2군, 생강사심탕을 처리한 SSST 2군으로 나누었다. 7일동안 약물을 투여 한 후 HSV를 1차 접종하였고, 실험 10일째부터 연속 7일동안 다시 약

물을 투여하고, 실험 17일째 2차 접종을 하였다. HSV 접종후에 사심탕이 작용하는지 알아보려고 HSV 감염 후에 감초사심탕을 투여한 GSST 3군, 반하사심탕을 투여한 BSST 3군, 생강사심탕을 투여한 SSST 3군으로 나누었다. 실험 첫날에 HSV를 1차 접종 후 약물을 7일동안 연속 투여하였고, 실험 10일째 역시 HSV를 재접종한 후 약물을 7일동안 연속 투여하였다. 모든 실험은 16주 동안 증상의 발현 유무를 관찰하였고, 실험 종료일에 동물을 희생하여 시료를 채취하였다.

Table 1. Prescription of Gamchosasim-tang(Gancaoxiexin-tang).

Herbal name	Pharmacognostic Name	Scientific Name	Amount(g)
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	Glycyrrhiza uralensis	15.00
黃 芩	Scutellariae Radix	Scutellaria baicalensis	11.25
乾 薑	Zingiberis Rhizoma	Zingiber officinale	11.25
人 蔘	Ginseng Radix	Panax ginseng	11.25
半 夏	Pinelliae Rhizoma	Pinellia ternata	18.75
黃 連	Coptidis Rhizoma	Coptis chinensis	3.75
大 棗	Jujubae Rhizoma	Zizyphus jujuba	11.00
Total			82.25

Table 2. Prescription of Banhasasim-tang(Banxiaxiexin-tang)

Herbal name	Pharmacognostic Name	Scientific Name	Amount(g)
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	Glycyrrhiza uralensis	7.50
黃 芩	Scutellariae Radix	Scutellaria baicalensis	7.50
乾 薑	Zingiberis Rhizoma	Zingiber officinale	7.50
人 蔘	Ginseng Radix	Panax ginseng	7.50
半 夏	Pinelliae Rhizoma	Pinellia ternata	11.25
黃 連	Coptidis Rhizoma	Coptis chinensis	3.75
大 棗	Jujubae Rhizoma	Zizyphus jujuba	11.00
Total			56.00

Table 3. Prescription of Saenggangsasim-tang(Shengjiangxiexin-tang)

Herbal name	Pharmacognostic Name	Scientific Name	Amount(g)
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	Glycyrrhiza uralensis	11.25
黃 芩	Scutellariae Radix	Scutellaria baicalensis	11.25
乾 薑	Zingiberis Rhizoma	Zingiber officinale	3.75
人 蔘	Ginseng Radix	Panax ginseng	11.25
半 夏	Pinelliae Rhizoma	Pinellia ternata	18.00
黃 連	Coptidis Rhizoma	Coptis chinensis	3.75
大 棗	Jujubae Rhizoma	Zizyphus jujuba	11.00
生 薑	Zingiberis Rhizoma Recens	Zingiber officinale	15.00
Total			85.25

4. 증상의 관찰

베체트병의 증상 발현 유무에 대한 평가는 Sohn¹²⁾ 등의 방법을 준용하였다. 주증상(major symptoms)으로는 구강 증상, 생식기 증상, 피부 궤양, 안구증상을 관찰하였고, 부증상(minor symptoms)으로는 관절염, 위장관 증상, 신경학적 증상을 관찰하였다. 본 연구에서는 육안관찰을 통하여 구강, 생식기, 피부, 안구 등의 염증 유무를 보았고, 관절염은 족부의 부종 유무를 보았으며, 위장관 증상은 설사 및 항문 주위의 염증정도로 확인하였고, 신경학적 증상은 마비 증상이나 특이한 운동장애 유무를 기준으로 하였다. 증상 관찰은 실험 첫날부터 16주 동안 매일 오전 11시경에 실시하였다. 주증상과 부증상중에 하나라도 관찰되어지는 경우는 HSV 감염 마우스로 하였고, 주증상과 부증상이 하나이상 동시에 나타나는 경우는 베체트병 유발마우스(BD 마우스)로 하였다.

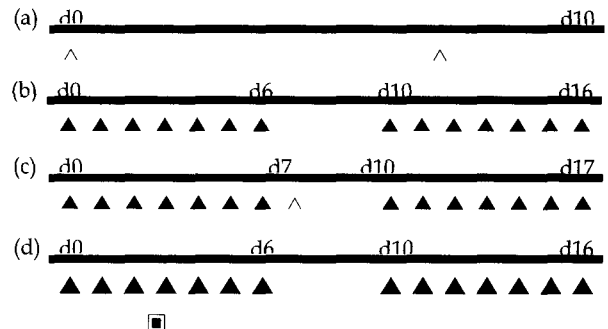


Fig. 1. Schematic Diagram of Herpes Simplex Virus (HSV) Inoculation and GSST, BSST, SSST Treatment. There are four experimental group : (a) HSV inoculation on day 0 and 10 ; (b) oral GSST, BSST and SSST for seven consecutive days 0-6 and day 10-16 ; (c) as (b), followed by HSV inoculation day 0 and 10 ; (d) as (b), with HSV inoculation on day 0 and 10. The total duration of observation was 16 weeks. ▲ : GSST, BSST, SSST administration. △ : HSV inoculation. ■ : Experiment end. Sacrifice animals.

5. HSV DNA 검출

1) Positive control

HSV를 감염시킨 vero cell로부터 Accuprep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하여 각군의 HSV 감염여부 확인을 위한 PCR 결과의 positive control로 사용하였다. 또한 negative control은 vero cell로부터 추출한 DNA를 가지고 사용하였다.

2) DNA isolation

병변부위를 절개하여 액체 질소로 조직을 갈아서 Accuprep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 DNA를 추출하였다. 25-50mg의 조직을 세절하여 effendof tube에서 tissue lysis buffer 200µl와 함께 혼합하였다. 그리고 proteinase K를 20µl 가하여 vortexing 후 60℃에서 1 시간동안 조직이 완전히 lysis가 될 때까지 반응시켰다. 그 후 시료에 binding buffer를 200µl 가하여 즉시 vortexing한 후 다시 60℃에서 10분 동안 반응하였다. Isopropanol 100µl를 가하여 잘 섞은 후 원심 분리하여 상층액을 binding column reservoir로 조심스럽게 옮긴 후 6,368 ×g에서 1분 동안 원심 분리하였다. Column을 washing buffer로 세척 한 후 원심 분리하여 깨끗이 ethanol을 제거하였다. Elution buffer 200µl를 column에 가하여 DNA를 추출하여 UV spectrophotometer(Hitachi, Japan) (260/280nm)로 정량하였다.

3) PCR

병변조직으로부터 추출한 DNA 100ng을 hsv primer 1µM, dNTP mixture (Promega, C1141) 200 µM, Taq polymerase (Promega, M1661) 2U를 잘 섞은 후 PCR machine에서 denaturation은 94℃ 5min으로, annealing은 94℃ 30sec, 56℃ 30sec, 72℃ 1min으로 35cycles를 하였고, extension은 72℃ 10min 하였다. PCR product는 1.8% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

6. 비장의 적출

실험 종료 후에 마우스를 경추 탈구로 희생시킨 후, 알콜 (70%)로 마우스의 측복부를 소독하였다. 그 후 멸균된 가위와 핀셋을 이용하여 조심스럽게 비장을 적출하였다. 적출 즉시 전체

부위의 1/3은 RT-PCR용으로 Cryogenic tube(Corning, USA)에 넣어 -70℃에서 보관하였다. 나머지 비장에서는 면역능을 측정하기 위한 임파구를 분리하여 실험에 사용하였다.

7. RT-PCR

1) Total RNA isolation

Tissue RNA PrepMate kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 마우스의 비장으로부터 total RNA를 추출하였다. 비장 100mg을 1ml의 lysis buffer를 넣고 갈아서 실온에서 5분 동안 반응하였다. chloroform을 0.4배 부피로 첨가하여 4℃에서 5분 동안 반응한 후, 14,328 ×g에서 10분동안 원심 분리하여 상층액을 분리한 후, Phenol : Chloroform (5:1)(Sigma, USA)을 동부피로 처리하여 원심분리 하였고 다시 상층액을 새 tube로 옮겼다. 여기에 동부피의 isopropyl alcohol을 넣고 -20℃에서 1시간 반응한 후 다시 원심분리 하였다. Pellet을 80% 에탄올(in DEPC-treated water)로 세척하고 speed vacuum(Heto, Denmark)에서 건조시킨 후 RNase-free water에서 용해시켜 얻어진 total RNA를 UV spectrophotometer(Hitachi, Japan) (260/280nm)로 정량하였다.

2) Reverse transcription-polymerase chain reaction

비장 조직으로부터 분리한 total RNA 2µg를 가지고 β-actin과 IFN-γ에 대해서는 oligo-(dT)15 primer (Promega, USA) 1µl를 사용하고, IL-2, IL-4, IL-10에 대해서는 Bioneer사에서 제작한 gene specific antisense primer 1µM를 사용하여 70℃에서 10분 동안 preincubation한 후, dNTP mixture 1mM, MgCl₂ 5mM, reaction buffer (10mM Tris-HCl [pH9.0 at 25℃], 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), RNasin ribonuclease inhibitor (Promega, USA) 1U/λ, AMV reverse transcriptase (Promega, USA) 15U를 넣고 잘 섞은 후 42℃에서 60분간 반응시킨 후 95℃에서 5분간 AMV reverse transcriptase를 불활성 시켰다.

여기서 얻은 cDNA를 2µl씩 분주하여 PCR 반응을 위해 -20℃에 보관하였다. Reverse transcription으로부터 얻은 cDNA 2µl를 dNTP mixture 200µM, gene specific primer 300nM, MgCl₂ 2mM, reaction buffer(10mM Tris-HCl [pH9.0 at 25℃], 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), Taq polymerase 2U을 잘 섞어 PCR machine에서 denaturation은 94℃ 5min으로, annealing은 94℃ 30sec, 56℃ 30sec, 72℃ 1min으로 35cycles를 하였고, extension은 72℃ 10min하였다. PCR product를 1.8% agarose gel 전기영동으로 확인하였다. 이때 사용한 사이토키인과 β-actin의 specific primer는 다음과 같다.

8. Splenocytes isolation

면역능을 측정하기 위한 시료로 마우스의 비장세포를 사용하였다. 비장세포는 각각의 실험 마지막 날 처사시킨 마우스에서 무균상태로 적출하여 4℃의 HBSS로 2회 세척 한 뒤 이를 직경 60 mm의 세포배양용 접시에 옮기고, HBSS를 가한 후 두 장의 멸균된 slide glass로 부드럽게 압착하여 잘게 부순 뒤 반복 여과시켜 작은 조직편을 제거하고 부유세포를 모았다. 이 세포 부유액을

원심 분리한 후 1ml의 증류수로 5-6초간 처리 하여 Hypotonic shock으로 적혈구를 용해시킨 뒤 10× HBSS (Gibco, USA)로 희석하고 300 ×g로 원심 분리하여 임파구를 분리하였다. 분리된 임파구는 혼합배지에 재부유 시킨 후, 각각의 실험 항목에 맞추어 세포수를 조정 한 뒤 본 실험에 사용하였다. 비장에서 얻은 임파구를 5×10⁶ cells/ml로 조정 한 뒤, 여기에 100µg/ml로 조정된 Concavalin-A(Sigma, USA)를 가하고, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 상층액을 수거하여 IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ를 측정하였다.

Table 4. Specific Primers for Cytokines and β-actin

Name (Product size)		primer
β-actin (349 bp)	sense	5'-TGGAACTCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'
	anti-sense	5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'
IL-2 (168 bp)	sense	5'-TGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAG-3'
	anti-sense	5'-GAGTCAAATCCAGAACATGCCGAG-3'
IL-4 (132 bp)	sense	5'-ACGCCATGCACGGAGATGGAT-3'
	anti-sense	5'-CAAGCATGGAGTTTCC-3'
IL-10 (421 bp)	sense	5'-AGACTTCTTTCAAACAAAGGACCAGCTGGA-3'
	anti-sense	5'-CCTGGAGTCCAGCAGACTCAATACACTGC-3'
IFN-γ (247 bp)	sense	5'-AGCGGCTGACTGAAGTCAAGTGTAG-3'
	anti-sense	5'-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGGG-3'

9. ELISA assay

IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ의 생산능은 ELISA assay를 이용하여 여서도 측정하였다. 이 경우 Quantikine[®] M(R&D systems, USA)의 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 이 ELISA kit는 sandwich enzyme immunoassay technique를 이용하는 것으로, microplate에 pre-coated된 정제된 polyclonal antibody에 시료를 처리하여 결합시킨 후 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 standard sample의 표준곡선으로부터 시료의 IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ 양을 계산하는 방법으로 모든 과정은 제조회사의 지침을 따랐다.

96 well microtiter plate의 각 well에 50µl의 Assay Diluent를 넣고, 다시 standard, control, 시료를 각 well에 50µl씩 분주한 후 1분정도 조심스럽게 tapping하고 plate cover로 덮어 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응 종료 후 wash buffer로 5회 세척하고, 100µl의 conjugate를 넣은 후 plate cover로 덮은 뒤 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 반응 종료 후 wash buffer로 5회 세척한 후, 100µl의 substrate solution을 넣고 실온에서 30분 동안 반응하였다. 이때, IL-2의 경우는 빛을 차단하였다. 반응 종료후에 100µl의 stop solution을 넣고 반응을 중지하였다. 그 후 ELISA reader(Emax, USA)로 450nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다.

10. 통계 처리

실험결과에 대한 통계처리는 STATISTICA(ver 6.0, Statsoft, USA)를 이용하여 student's T-test와 ANOVA를 실시하였고, 유의성 검정은 p<0.05인 경우만을 인정하였다.

실험성적

1. 증상관찰

HSV 감염에 의한 증상발현을 관찰한 결과, control군의 경우, 주증상과 부증상을 포함하는 증상이 56.7%로 관찰되었고, GSST 1, BSST 1, SSST 1에서는 증상 발현이 관찰되지 않았고, GSST 2는 46.7%, BSST 2는 43.4%, SSST 2는 50.0%가 관찰되었고, GSST 3는 43.4%, BSST 3는 43.3%, SSST 3는 53.3%에서는 증상이 나타났다. 또한 주증상과 부증상이 동시에 나타나는 Behçet's disease mouse(BD mouse)의 경우는 GSST 1, BSST 1, SSST 1을 제외한 모든 군에서 비슷하게 관찰되었는데 control은 35.3%, GSST 2는 35.7%, BSST 2는 46.2%, SSST 2는 33.3%, GSST 3는 38.5%, BSST 3는 30.8%, SSST 3는 31.3%의 비율을 나타냈다 (Table 5, Fig. 2).

Table 5. Symptoms and Numbers of Manifested Mice after Ear-lobe Inoculation with 1.0×10^6 p.f.u of HSV

Experimental Group	Number of mice with symptoms/Total mice (%)	Number of BD mice/Single symptom mice (%)
Control	17/30 (56.7)	6/17 (35.3)
GSST 1	0/30 (0.0)	0/0 (0.0)
BSST 1	0/30 (0.0)	0/0 (0.0)
SSST 1	0/30 (0.0)	0/0 (0.0)
GSST 2	14/30 (46.7)	5/14 (35.7)
BSST 2	13/30 (43.3)	6/13 (46.2)
SSST 2	15/30 (50.0)	5/15 (33.3)
GSST 3	13/30 (43.3)	5/13 (38.5)
BSST 3	13/30 (43.3)	4/13 (30.8)
SSST 3	16/30 (53.3)	5/16 (31.3)

Control : HSV inoculation GSST 1, BSST 1, SSST 1 : GSST, BSST, and SSST administration GSST 2, BSST 2, SSST 2 : GSST, BSST, and SSST administration after HSV inoculation GSST 3, BSST 3, SSST 3 : GSST, BSST, and SSST administration with HSV inoculation BD mice : Multisystemic disorder with mucocutaneous, ocular, arthritic, vascular, gastrointestinal and central nervous system involvement were appeared in HSV inoculated mice. A mouse with at least one major and one minor symptom were classified as having Behçet's Disease(BD). In order to classify the symptomatic mice as having BD, we followed a revised Japanese classification with minor modification. Oral, genital and other skin ulcers(including bu.a & crust) and eye symptoms were classified as major symptoms, and arthritic, vascular, gastrointestinal and central nervous system involvement were classified to minor symptoms.

2. HSV DNA 검출

HSV에 감염이 정상적으로 이루어졌는지를 확인하기 위하여 발병부위로부터 추출한 DNA를 PCR을 통하여 확인한 결과, 증상이 보이는 마우스에서는 positive control과 같은 크기의 HSV DNA band(289bp)를 확인 할 수 있었으며, 증상이 보이지 않는 군에서는 HSV DNA band를 확인 할 수 없었다(Fig. 3).

3. RT-PCR

1) IL-2의 mRNA 발현

사심탕의 투여 효과를 알아보기 위하여 HSV 감염 마우스에 감초사심탕, 반하사심탕, 생강사심탕을 투여한 후 비장조직에서 추출한 total RNA로부터 RT-PCR을 통하여 internal control인 β -actin과 cytokine mRNA의 발현을 비교하였다. control군에 비하여 BSST 2와 BSST 3에서 IL-2 mRNA 발현이 현저히 증가함을 확인할 수 있었으며, GSST 2, GSST 3와 SSST 2, SSST 3에서도

발현이 증가하였음을 확인 할 수 있었다(Fig. 4).

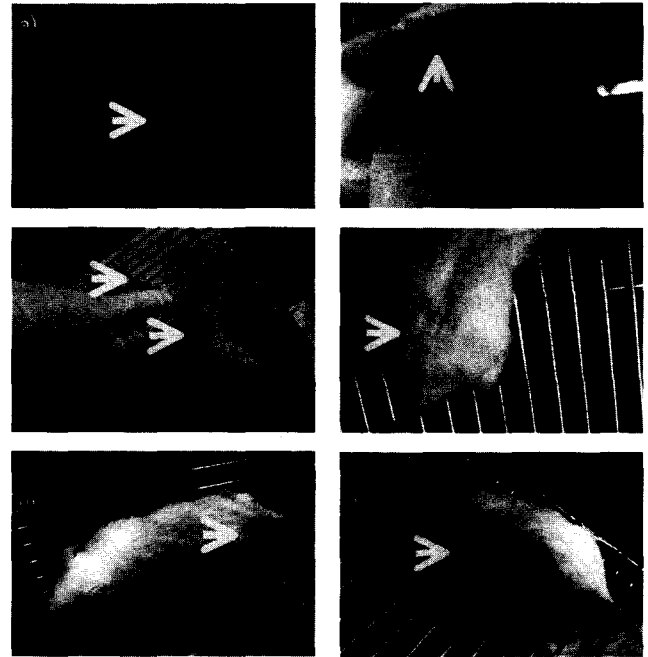


Fig. 2. Behçet's Disease like Symptoms in Herpes Simplex Virus Induced Mice. a) Skin ulcer at ear lobe b) Skin ulcer at face and abdomen c) Skin ulcer at tail d) Skin ulcer at back and hair loss e) Skin ulcer at tail, back and eye symptom f) neural involvement

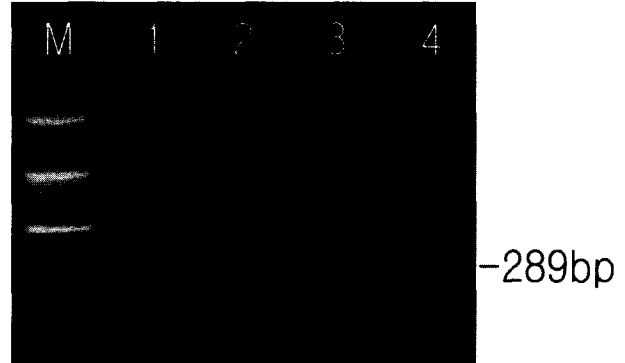


Fig. 3. Electrophoresis of Amplified DNA by PCR showing the 289-bp sized DNA. M : 100bp DNA ladder as a size marker 1 : positive control 2 : negative control 3-4 : skin tissue from lesion

2) IL-4

사심탕의 투여 효과를 알아보기 위하여 HSV 감염 마우스에 감초사심탕, 반하사심탕, 생강사심탕을 투여한 후 비장조직에서 추출한 total RNA로부터 RT-PCR을 통하여 internal control인 β -actin과 cytokine mRNA의 발현을 비교하였다. control군을 포함한 모든 군에서의 IL-4 mRNA의 발현은 확인되지 않았다(Fig. 5).

3) IL-10

사심탕의 투여 효과를 알아보기 위하여 HSV 감염 마우스에 감초사심탕, 반하사심탕, 생강사심탕을 투여한 후 비장조직에서 추출한 total RNA로부터 RT-PCR을 통하여 internal control인 β -actin과 cytokine mRNA의 발현을 비교하였다. control군을 포함한 모든 군에서의 IL-10 mRNA 발현이 되었음을 확인하였으

며, 특히 GSST 2, BSST 2, BSST 3의 경우 control군에 비하여 미약하나마 증가했음을 확인하였다(Fig. 6).

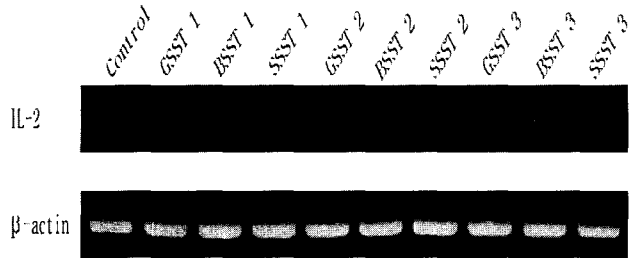


Fig. 4. Expression of Interleukin-2 by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analysis in Spleen of Mouse with Behçet's Disease. Control : HSV inoculation GSST 1, BSST 1, SSST 1 : GSST, BSST, and SSST administration GSST 2, BSST 2, SSST 2 : GSST, BSST, and SSST administration after HSV inoculation GSST 3, BSST 3, SSST 3 : GSST, BSST, and SSST administration with HSV inoculation

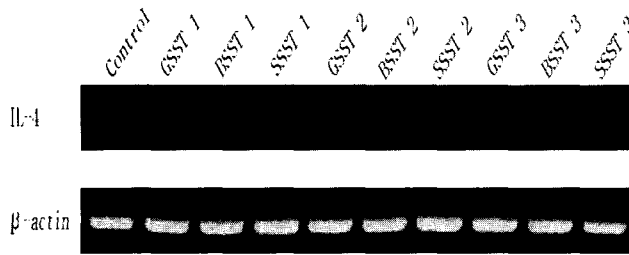


Fig. 5. Expression of Interleukin-4 by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analysis in Spleen of Mouse with Behçet's Disease. Control : HSV inoculation GSST 1, BSST 1, SSST 1 : GSST, BSST, and SSST administration GSST 2, BSST 2, SSST 2 : GSST, BSST, and SSST administration after HSV inoculation GSST 3, BSST 3, SSST 3 : GSST, BSST, and SSST administration with HSV inoculation

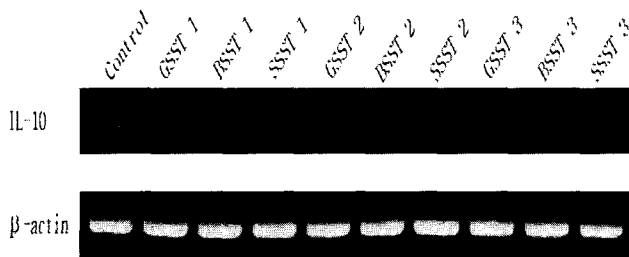


Fig. 6. Expression of Interleukin-10 by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analysis in Spleen of Mouse with Behçet's Disease. Control : HSV inoculation GSST 1, BSST 1, SSST 1 : GSST, BSST, and SSST administration GSST 2, BSST 2, SSST 2 : GSST, BSST, and SSST administration after HSV inoculation GSST 3, BSST 3, SSST 3 : GSST, BSST, and SSST administration with HSV inoculation

4) IFN- γ

사심탕의 투여 효과를 알아보기 위하여 HSV 감염 마우스에 감초사심탕, 반하사심탕, 생강사심탕을 투여한 후 비장조직에서 추출한 total RNA로부터 RT-PCR을 통하여 internal control인 β -actin과 cytokine mRNA의 발현을 비교하였다.

β -actin mRNA와 비교할 때 모든 군에서 IFN- γ 의 발현이 보

였고, control군과 다른 실험군들간의 IFN- γ mRNA 발현의 정도 차이를 확인 할 수 없었다(Fig. 7).

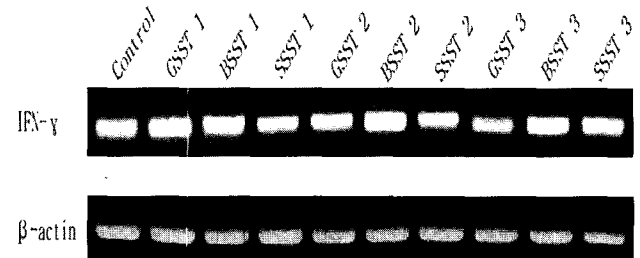


Fig. 7. Expression of Interferon- γ by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analysis in Spleen of Mouse with Behçet's Disease. Control : HSV inoculation GSST 1, BSST 1, SSST 1 : GSST, BSST, and SSST administration GSST 2, BSST 2, SSST 2 : GSST, BSST, and SSST administration after HSV inoculation GSST 3, BSST 3, SSST 3 : GSST, BSST, and SSST administration with HSV inoculation

4. ELISA assay

1) IL-2

HSV접종과 사심탕 투여에 따른 IL-2의 발현량을 ELISA로 측정된 결과 control은 255.6 \pm 60.2 (pg/ml)을 나타냈고, 사심탕만을 투여한 GSST 1은 201.9 \pm 59.5 (pg/ml), BSST 1은 217.4 \pm 50.0 (pg/ml), SSST 1은 189.3 \pm 35.8 (pg/ml)을 나타냈고, HSV 접종전 사심탕을 투여한 GSST 2는 455.3 \pm 100.7 (pg/ml), BSST 2는 643.6 \pm 319.2 (pg/ml), SSST 2는 393.4 \pm 162.1 (pg/ml)을 나타냈고, HSV의 접종과 사심탕투여를 같이 시작한 GSST 3는 400.4 \pm 167.5 (pg/ml), BSST 3는 378.6 \pm 307.4 (pg/ml), SSST 3는 323.6 \pm 111.9 (pg/ml)을 나타냈다(Table 6). GSST 2, BSST 2, SSST 2, GSST 3는 control에 비하여 유의하게 증가된 것으로 나타났다(p<0.05). 대체로 사심탕만 투여한 군은 IL-2의 양이 낮았으며, 접종과 사심탕을 투여한 군은 control에 비하여 높은 것으로 나타났다.

Table 6. Identification of Interleukin-2 Expression in Splenocytes by ELISA.

Group	Interleukin - 2 (pg/ml)
Control	255.6 \pm 60.2
GSST 1	201.9 \pm 59.5
BSST 1	217.4 \pm 50.0
SSST 1	189.3 \pm 35.8*
GSST 2	455.3 \pm 100.7*
BSST 2	643.6 \pm 319.2*
SSST 2	393.4 \pm 162.1*
GSST 3	400.4 \pm 167.5*
BSST 3	378.6 \pm 307.4
SSST 3	323.6 \pm 111.9

Control : HSV inoculation GSST 1, BSST 1, SSST 1 : GSST, BSST, and SSST administration GSST 2, BSST 2, SSST 2 : GSST, BSST, and SSST administration after HSV inoculation GSST 3, BSST 3, SSST 3 : GSST, BSST, and SSST administration with HSV inoculation * : P < 0.05

2) IL-4

HSV접종과 사심탕 투여에 따른 IL-4의 발현량을 ELISA로 측정된 결과 control군은 235.8 \pm 78.4 (pg/ml)로 나타났고, 사심탕만을 투여한 GSST 1은 191.0 \pm 32.9 (pg/ml), BSST 1은 240.5 \pm 40.0(pg/ml), SSST 1은 227.6 \pm 59.2 (pg/ml)을 나타냈고,

HSV 접종전 사심탕을 투여한 GSST 2는 248.9±43.5 (pg/ml), BSST 2는 254.5±87.8 (pg/ml), SSST 2는 208.3±34.0 (pg/ml)으로 나타났고, HSV접종과 사심탕을 투여를 같이 시작한 GSST 3는 267.7±75.0 (pg/ml), BSST 3는 233.6±91.0 (pg/ml), SSST 3는 256.5±56.0(pg/ml)을 보였다(Table VII). control과 비교하여 모든 군에서 IL-4의 발현의 유의한 차이는 보이지 않았다.

Table 7. Identification of Interleukin-4 Expression in Splenocytes by ELISA.

Group	Interleukin - 4 (pg/ml)
Control	235.8 ± 78.4
GSST 1	191.0 ± 32.9
BSST 1	240.5 ± 40.0
SSST 1	227.6 ± 59.2
GSST 2	248.9 ± 43.5
BSST 2	254.5 ± 87.8
SSST 2	208.3 ± 34.0
GSST 3	267.7 ± 75.0
BSST 3	233.6 ± 91.0
SSST 3	256.5 ± 56.0

Control : HSV inoculation GSST 1, BSST 1, SSST 1 : GSST, BSST, and SSST administration GSST 2, BSST 2, SSST 2 : GSST, BSST, and SSST administration after HSV inoculation GSST 3, BSST 3, SSST 3 : GSST, BSST, and SSST administration with HSV inoculation * : P < 0.05

3) IL-10

HSV접종과 사심탕 투여에 따른 IL-10의 발현량을 ELISA로 측정된 결과 control군은 80.1±22.2 (pg/ml)을 나타냈고, 사심탕만을 투여한 GSST 1은 144.2±46.4 (pg/ml), BSST 1은 90.7±10.2 (pg/ml), SSST 1은 72.2±21.2 (pg/ml)을 나타냈고, HSV 접종전 사심탕을 투여한 GSST 2는 74.3±22.2 (pg/ml), BSST 2는 96.2±68.6 (pg/ml), SSST 2는 61.0±50.4 (pg/ml)을 나타냈고, HSV 접종과 사심탕 투여를 같이 시작한 GSST 3는 61.6±27.4 (pg/ml), BSST 3는 89.2±55.4 (pg/ml), SSST 3는 66.5±30.1 (pg/ml)을 보였다(Table 8).

Table 8. Identification of Interleukin-10 Expression in Splenocytes by ELISA.

Group	Interleukin - 10 (pg/ml)
Control	80.1 ± 22.2
GSST 1	144.2 ± 46.4*
BSST 1	90.7 ± 10.2
SSST 1	72.2 ± 21.2
GSST 2	74.3 ± 22.2
BSST 2	96.2 ± 68.6
SSST 2	61.0 ± 50.4
GSST 3	61.6 ± 27.4
BSST 3	89.2 ± 55.4
SSST 3	66.5 ± 30.1

Control : HSV inoculation GSST 1, BSST 1, SSST 1 : GSST, BSST, and SSST administration GSST 2, BSST 2, SSST 2 : GSST, BSST, and SSST administration after HSV inoculation GSST 3, BSST 3, SSST 3 : GSST, BSST, and SSST administration with HSV inoculation * : P < 0.05

4) IFN-γ

HSV접종과 사심탕 투여에 따른 IL-4의 발현량을 ELISA로 측정된 결과 control군은 79.9±55.6 (pg/ml)을 나타냈고, 사심탕만을 투여한 GSST 1은 11.4±21.2 (pg/ml), BSST 1은

11.5±12.5(pg/ml), SSST 1은 3.4±6.6 (pg/ml)을 나타냈고, HSV 접종전 사심탕을 투여한 GSST 2는 211.7±128.4 (pg/ml), BSST 2는 505.6±329.9 (pg/ml), SSST 2는 313.0±273.3 (pg/ml)을 나타냈고, HSV 접종과 사심탕 투여를 같이 시작한 GSST 3는 186.1±214.4 (pg/ml), BSST 3는 349.6±364.4 (pg/ml), SSST 3는 204.8±145.5(pg/ml)을 보였다(Table 9). control에 비하여 사심탕만 투여한 GSST 1, BSST 1, SSST 1은 유의하게 낮았고, GSST 2, BSST 2, SSST 2, SSST 3는 유의하게 높게 나타났으며(p<0.05), GSST 3, BSST 3는 높은 경향을 보였다.

Table 9. Identification of Interferon-γ Expression in Splenocytes by ELISA.

Group	Interferon - γ (pg/ml)
Control	79.9 ± 55.6
GSST 1	11.4 ± 21.2*
BSST 1	11.5 ± 12.5*
SSST 1	3.4 ± 6.6*
GSST 2	211.7 ± 128.4*
BSST 2	505.6 ± 329.9*
SSST 2	313.0 ± 273.3*
GSST 3	186.1 ± 214.4
BSST 3	349.6 ± 364.4
SSST 3	204.8 ± 145.5*

Control : HSV inoculation GSST 1, BSST 1, SSST 1 : GSST, BSST, and SSST administration GSST 2, BSST 2, SSST 2 : GSST, BSST, and SSST administration after HSV inoculation GSST 3, BSST 3, SSST 3 : GSST, BSST, and SSST administration with HSV inoculation * : P < 0.05

고 찰

베체트병(Behçet's disease)은 터키의 의사 Hulusi Behçet가 재발성 구강 및 외음부 궤양, 안질환(recurrent oral and genital ulceration, as well as hypopyon-iritis)을 갖는 질병으로 정의¹⁾한 후 수차례의 진단 기준을 수정해 가면서 현재에 이르고 있다. 베체트병의 진단 기준으로 1990년에 ISGBD(International study group for Behçet's disease)에서 제시한 내용에는 재발성 구강궤양을 필수 증상으로 하고, 재발성 외음부 궤양, 안질환, 피부질환이 두가지 이상 포함될 경우 베체트병으로 인정하고 있다¹³⁾. 베체트병의 동물모델은 베체트의 병인을 설명하는 과정에서 이용하였는데, 가장 먼저 보고된 것은 Hori 등에 의하여 환경오염물질인 사료와 함께 섭취한 Pitman-Moors miniature swine 모델로 염소, 황, 인 등이 높은 농도로 검출되었으나 사람에서는 검출되지 않았다¹⁴⁾. 그 후 HLA-B15과 베체트병 사이에 관련성이 보고되면서 transgenic mouse로써 실험하였고^{15,16)}, HSP(Heat Shock Protein)와 베체트병과의 관련성에 대한 보고 이후, Stanford¹⁷⁾ 등은 사람 60kD HSP 중 peptide 336-351을 Lewis rat의 피하에 주사하여 약 80%에서 외형적 또는 조직학적으로 uveitis를 나타내었으나, 다른 증상은 발현되지 못하였다. 바이러스를 이용한 동물 모형으로는 손 등¹⁸⁾의 방법이 있는데 동물 모형중 베체트병을 가장 잘 반영한 것으로 평가된다.

베체트병과 일치되는 한의병명은 없다¹⁹⁾. 그러나 대다수의 연구자들은 『金匱要略·百合狐惑陰陽毒病脈證治』의 '狐惑之爲病 狀如傷寒 默默欲眠 目不得閉 臥起不安 蝕于喉爲惑 蝕于陰

爲狐 不欲飲食 惡聞食臭 其面目乍赤 乍黑 乍白 蝕于上部則臂喝 甘草瀉心湯主之⁷⁾에서 제시한 狐惑病을 베체트병과 가장 유사한 것으로 보고 있다¹⁹⁾. 근래 중국에서는 베체트병을 ‘白塞氏綜合症’이라고 명명하고 있으며, 임상증상을 陰虛熱毒, 濕熱下注, 寒凝血瘀, 肝腎陰虛로 분류하여 養血滋陰, 活血解毒, 清熱利濕, 柔肝和脾, 溫經散寒, 活血化瘀, 養陰清熱, 滋補肝腎의 처방을⁹⁾, 베체트병의 中醫治療 경험으로는 方²⁰⁾의 경우 當歸活血湯과 甘草瀉心湯의 합방으로 32예를 치료한 결과 93.8%에서 유효한 효과를 보았다고 하였으며, 孫²¹⁾ 등은 龍膽瀉肝湯을 清瀉肝經濕熱의 목적으로 투여한 30예에서 97%의 유효한 효과를 보고하였고, 孟²²⁾ 등은 내치법과 외치법을 동시에 시행하여 81.18%의 유효한 효과를 보고 하였다. 한국에서는 손²³⁾ 등이 가미청혈보혈탕과 가미용담사간탕을 콜키친과 복합 투여하여 베체트병 동물모형에서 증상호전에 도움이 됨을 보고하였다. 그러나 베체트병이 회복과 재발을 반복하고, 질병의 지속기간이 수개월에서 수년간 지속되는 점으로 본다면 결과에 대한 정밀한 연구가 필요하리라 생각된다.

본 연구에 사용된 감초사심탕, 반하사심탕, 생강사심탕은 장중경의 상한론, 금궤요략에 처음 기술되어 있는데, 甘草瀉心湯은 傷寒論에 ‘傷寒 中風 醫反下之 其人 下利 日數十行 穀不化 腹中雷鳴 心下痞鞭而滿 乾嘔 心煩 不得安 醫見心下痞 謂病不盡 復下之 其病益甚 此非結熱 但以胃中虛 客氣上逆 故使鞭也 甘草瀉心湯主之’라 하여 거듭된 誤下로 胃氣가 거듭 虛해져 痞症과 下利가 발생할 경우 補胃泄痞의 효능으로 사용하였다²⁴⁾. 半夏瀉心湯은 傷寒論에는 ‘傷寒五六日 嘔而發熱者 柴胡湯證具 而以他藥下之 柴胡證仍在者 復與柴胡湯 此雖已下之 不爲逆 必蒸蒸而振 卻發熱汗出而解 若心下滿而鞭痛者 此爲結胸也 大陷胸湯主之 但滿而不痛者 此爲痞 柴胡不中與之 宜半夏瀉心湯’이라 하였고, 金匱要略에는 ‘嘔而腸鳴 心下痞者 半夏瀉心湯主之’이라 하였는데, 이를 종합하면 柴胡湯證의 誤下이후에 邪氣가 內陷하여 正虛邪結의 結果 胃氣가 壅滯된 痞症이 되고 이 경우 치료제로 半夏瀉心湯을 사용하였다^{24,25)}.

生薑瀉心湯은 傷寒論에 ‘傷寒 汗出解之後 胃中不和 心下痞鞭 乾噎食臭 脇下有水氣 腹中雷鳴 下利者 生薑瀉心湯主之’이라 하였는데, 이는 胃中의 水와 食이 消化되지 않아서 생긴 痞症과 下利에 사용된다²⁴⁾. 본 연구에서 사용한 동물모형은 Sohn¹⁰⁾ 등이 베체트병의 원인중 하나인 HSV를 이용하여 만든 것으로 바이러스의 감염 여부에 따라 베체트병에서 보이는 증상들이 나타나며 조직검사는 환자와 매우 유사하다²⁶⁾. 본 연구의 경우 HSV 감염에 의한 증상발현은 control의 경우 주증상과 부증상을 포함하는 증상이 56.7%로 관찰되었고, GSST 1, BSST 1, SSST 1군에서는 증상 발현이 관찰되지 않았고, GSST 2는 46.7%, BSST 2는 43.3%, SSST2는 50.0%가 관찰되었고, GSST 3는 43.3%, BSST 3는 43.3%, SSST 3는 53.3%에서는 증상이 나타났다. 또한 주증상과 부증상이 동시에 나타나는 Behçet's disease mouse(BD mouse)의 경우는 GSST 1, BSST 1, SSST 1을 제외한 모든 군에서 비슷하게 관찰되었다(Table I, Fig. 2). 임상관찰결과 HSV 감염이후에 가장 두드러진 특징은 피부의 염증과 탈모, 구강궤양이었으며, 약물 치료와 더불어 control군에 비하여 줄어드는 경향이 있

었다. 또한 특징적으로 신경학적 증상(Fig. 2. f)이 나타나는 경우 약물 투여 후에 빠르게 호전되었다. 증상이 보이는 마우스의 조직에서 DNA를 추출하여 PCR을 한 결과 증상이 보이는 모든 군에서 HSV DNA band(289bp)를 발견 할 수 있었으며 이러한 결과는 Sohn의 결과와 동일하였다(Fig. 3). 싸이토카인(Cytokines)은 면역 반응시 세포 상호간의 역할에 중요한 기능을 담당하는 단백질로서 T세포의 종류에 따라 분비하는 싸이토카인이 다르다. 보조 T 세포(helper T cell)은 항원과 반응하여 cytokine을 분비하며, 1형 보조 T 세포(Th1)와 2형 보조 T 세포(Th2)로 나누어지고, 대체로 Th1은 IL-2, IFN- γ 등을 분비하여 세포내 세균사멸을 유도하고, Th2는 IL-4, IL-10 등을 분비하는데 B세포를 활성화시켜 항원제거를 유도한다²⁷⁾. 항원 제시세포가 바이러스에 노출되면 Th1(IFN- γ , IL-2)과 같은 싸이토카인을 분비하여 방어작용을 하는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 사심탕의 투여가 HSV 감염에 의한 베체트병의 역제를 면역반응과 관계하는지 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR, FACS assay, ELISA assay를 실시하였다.

IL-2는 autocrine과 paracrine성장인자로 작용하며 T 림프구의 사이토카인 생성을 강화하고 그 반응을 증폭시킨다²⁹⁾. IL-2의 경우 RT-PCR에서 BSST 3와 BSST 2에서 가장 많은 발현 양상을 보였고, 다른 군에서는 소량씩 발현되는 것으로 나타났다(Fig. 4). ELISA assay에서 control의 255.6±60.2 (pg/ml)에 비하여 GSST 1은 201.9±59.5 (pg/ml), BSST 1은 217.4±50.0 (pg/ml), SSST 1은 189.3±35.8 (pg/ml)을 보였고, GSST 2는 455.3±100.7 (pg/ml), BSST 2는 643.6±319.2 (pg/ml), SSST 2는 393.4±162.1 (pg/ml)을 보였고, GSST 3는 400.4±167.5 (pg/ml), BSST 3는 378.6±307.4 (pg/ml), SSST 3는 323.6±111.9 (pg/ml)을 보였다(Table VI). SSST 1, GSST 2, BSST 2, SSST 2, GSST 3는 control에 비하여 유의하게 높은 것으로 측정되었다($p < 0.05$). IL-4는 B세포의 활성화, 증식 및 분화에 관여하는 것으로 알려졌으나 최근의 많은 실험에 의하여 NK세포, 대식세포 및 기타 여러세포군에서 다양하게 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다³⁰⁾. IL-4의 경우에서, RT-PCR은 모든 군에서 발현되지 않았으며(Fig. 4), ELISA에서는 control은 235.8±78.4 (pg/ml)을 나타내었고, GSST 1은 191.0±32.9 (pg/ml), BSST 1은 240.5±40.0(pg/ml), SSST 1은 227.6±59.2 (pg/ml)을 보였고, GSST 2는 248.9±43.5 (pg/ml), BSST 2는 254.5±87.8 (pg/ml), SSST 2는 208.3±34.0 (pg/ml)을 나타내었고, GSST 3는 267.7±75.0 (pg/ml), BSST 3는 233.6±91.0 (pg/ml), SSST 3는 256.5±56.0(pg/ml)을 보였으며(Table VII), 유의한 차이는 없었다. IL-10은 마우스의 Th2에서 분리된 싸이토카인으로 Th1의 IL-2와 IFN- γ 의 분비를 억제하며³¹⁾, 싸이토카인 합성 저해인자로 알려져 있으며 IgE의 생성을 조절하는 역할도 담당한다³²⁾.

IL-10의 경우에서, RT-PCR은 control에 비하여 GSST 2, BSST 2, BSST 3에서 증가 함을 확인하였으며(Fig. 6), ELISA 측정결과 control은 80.1±22.2 (pg/ml)을 보였고, GSST 1은 144.2±46.4 (pg/ml), BSST 1은 90.7±10.2 (pg/ml), SSST 1은 72.2±21.2 (pg/ml)을 나타냈고, GSST 2는 74.3±22.2 (pg/ml), BSST 2는 96.2±68.6 (pg/ml), SSST 2는 61.0±50.4 (pg/ml)을 보

였고, GSST 3는 61.6±27.4 (pg/ml), BSST 3는 89.2±55.4 (pg/ml), SSST 3는 66.5±30.1 (pg/ml)을 보였으며(Table VIII), control군에 비하여 GSST 1에서 유의하게 증가된 것으로 나타났다(p<0.05). IFN- γ 는 약한 항바이러스작용, 대식세포의 활성화, 조직세포에 있는 클래스II분자를 활성화시키며³²⁾, 어떤 원인에 의하여 자극된 T 림프구는 자발적으로 IFN- γ 의 발현을 증가³³⁾시키고, 베체트병에서 혈액내의 IFN- γ 가 높은 것으로 보고되어 있다³⁴⁾. IFN- γ 의 경우에서, RT-PCR은 모든 군에서 많이 발현되었으나, 각군별 차이는 확인할 수 없었으며(Fig. 7), ELISA결과 control은 79.9±55.6 (pg/ml)을 나타내었고, GSST 1은 11.4±21.2 (pg/ml), BSST 1은 11.5±12.5(pg/ml), SSST 1은 3.4±6.6 (pg/ml)을 나타내었고, GSST 2는 211.7±128.4 (pg/ml), BSST 2는 505.6±329.9 (pg/ml), SSST 2는 313.0±273.3 (pg/ml)을 보였고, GSST 3는 186.1±214.4 (pg/ml), BSST 3는 349.6±364.4 (pg/ml), SSST 3는 204.8±145.5(pg/ml)을 보였으며(Table IX), control에 비하여 GSST 1, BSST 1, SSST 1은 유의한 감소경향을 보였고, GSST 2, BSST 2, SSST 2, SSST 3에서는 유의하게 증가하였고, GSST 3, BSST 3도 증가하는 경향을 보였다.

Kim 등³⁵⁾의 연구에 의하면 On-Chung-Eum을 베체트병 환자의 혈액에 처리하여 실험한 결과 Th1 사이토카인을 억제한다 하였고, Hamzaoui³⁶⁾ 등은 베체트병 환자의 serum Th1(IFN- γ , IL-12)과 Th2(IL-4, IL-6, IL-10)가 증가되며, 특히 IFN- γ 는 매우 높은 것으로 보고 하였고, Raziuddin³⁷⁾ 등은 베체트 환자의 혈청 중 Th1/Th2 pattern을 ELISA로 측정하여 Th2(IL-4, IL-10, IL-13)가 높은 반면 Th1(IFN- γ)는 매우 낮다는 결과를 보고하였다. Kim 등³⁸⁾은 甘草瀉心湯을 베체트병 환자의 혈액에 처리한 결과 PHA-stimulated된 혈청에서 proinflammatory cytokine(TNF- α , IL-1 β)뿐만 아니라 Th1(IFN- γ)도 조정되는 것으로 보고 하였다. Sohn 등³⁹⁾은 HSV를 감염시켜 베체트병을 유도한 Balb/c와 C57BL/6 마우스를 이용한 실험에서 Th1(IFN- γ)가 높고 Th2(IL-10)이 낮은 경우 베체트병의 유발이 적었음을 보고하며 Th1/Th2 사이토카인이 베체트병의 유발과 관계함을 설명하였다. 또 베체트병 동물모형에 antiviral agent인 famciclovir를 투여하여 면역반응을 관찰한 결과 증상이 재발된 마우스에서 IL-2의 발현이 보였으나 증상이 소실된 경우는 발현되지 않았으며, IFN- γ 는 발현의 유무에 상관없이 발현되었고, IL-4와 IL-10은 발현되지 않았다고 보고하였다¹²⁾. 또한 macrophage의 불활성으로 유도된 Th2 사이토카인의 발현은 베체트병을 유도한 동물모형의 증상소실과 관계있음을 설명하였으며, 특히 IL-4 mRNA의 발현이 약하게 나오더라도 증상 소실을 돕는다고 설명하였다⁴⁰⁾. 이상의 결과들은 Th1/Th2에 따라 증상이 호전정도가 나타남을 설명하였으나, Th1, Th2의 발현 유무에 따라 상반되는 결과들이 보였다. 그러나 면역계통의 반응이 베체트병의 호전에 매우 도움이 되는 것으로 생각된다. 본 연구의 경우 HSV Type-1으로 유도된 동물모형에서 증상이 보였으며, 사심탕 투여로 증상의 제거가 관찰되었으나 실험 전체적으로 증상의 발현 정도는 비슷하였다. 사이토카인의 변화를 보면, IFN- γ 의 발현에서 사심탕만 투여한 GSST1, BSST1, SSST1은 낮은 반면,

control은 상대적으로 높았으며, GSST2, BSST2, SSST2와 GSST3, BSST3, SSST3은 매우 높게 측정되었으며 이는 베체트병과 IFN- γ 와의 관계가 있다는 기존의 연구와 동일하였다. 또한 Th2와 관계 있는 IL-4, IL-10의 경우 control과 비교하여 차이를 보기 어려웠다. 이는 전체적으로 Th1의 발현이 높다는 결과이며 HSV를 이용한 동물 모형에서 항바이러스제 투여의 결과와 동일하다고 할 수 있다. 결국 사심탕의 투여가 면역기능에 영향을 주어 베체트병의 증상 소실 혹은 억제에 관여하는 것으로 추측되나 HSV 바이러스에 대한 작용기전 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

결론

HSV를 접종한 마우스에 감초사심탕, 반하사심탕, 생강사심탕을 투여하여 베체트병에서 보이는 증상의 발현 유무와 IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ 의 발현 변화를 RT-PCR, ELISA assay로 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 증상이 발현된 마우스에서는 HSV DNA가 검출되었다. HSV를 접종하고 사심탕을 투여한 결과 단일 증상은 감소하는 경향을 보였으나, 일단 증상이 발현된 이후에 마우스에서 보이는 증상은 유사하게 나타났다.

RT-PCR 결과, IFN- γ 는 모든 군에서 뚜렷하게 나타났고, IL-2는 BSST 2, BSST 3에서 뚜렷했으며, GSST 2, GSST 3, SSST 2, SSST 3에서 발현이 확인되었고, IL-10은 GSST 2, BSST 2, BSST 3, BSST 3에서 미미하게 발현되었고, IL-4는 발현이 확인되지 않았다. ELISA 결과 IL-2는 control에 비하여 GSST 2, BSST 2, SSST 2, GSST 3에서 유의있는 증가를 보였고, IFN- γ 는 control에 비하여 GSST 2, BSST 2, SSST 2, SSST 3에서 유의있는 증가를 보였으나, IFN- γ 의 결과는 RT-PCR에서 모든 군에서 뚜렷하게 모두 나타난 결과와 상이한 양상을 보였다. 이상의 결과로 보아 사심탕류는 면역기능에 영향을 주어 베체트병의 증상 소실 혹은 억제에 관여하는 것으로 추측되나, 작용기전에 대한 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

참고문헌

- Behçet H. über rezidivierende aphthose durch ein Virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge, und an den Genitalen. *Dermtol wöchenschr* 105:1952-1957.1937.
- 김홍석. 정상인과 베체트병 환자 혈청의 프로티옴 지도 비교. 연세대학교 대학원 2000.
- Gul A. Behçet disease. an update on the pathogenesis. *Clin Exp Rheumatol* 19(suppl 24):s6-s12.2001.
- Lehner T, Barnes CG, Criteria for diagnosis and classification of Behçet's syndrome. In : Lehner T, Barnes. CG(eds), Behçet's syndrome. London : Academic Press Inc1-9.1979.
- Ohno S. Behçet's disease in the world. Recent advances in Behçet's disease. Lehner T, Barnes CG(eds). *Royal Society of Medicine* 181-186.1986.
- Dongsik Bang, Snagho Oh, Kwang-hoon Lee, Eun-so Lee,

- Sungnack Lee. Influence of Sex on patients with Behçet's Disease in Korea. *J Korean Med Sci* 18:231-235.2003.
7. 張仲景, 仲景全書, 大星文化社 360.1988.
 8. 郭秀梅, 岡田研吉. 日本醫家金匱要略注解輯要. 學苑出版社 74.1999.
 9. 陣貴廷, 楊思澍. 實用中西醫結合診斷治療學, 一中社 652-656.1992.
 10. Seonghyang Sohn, Eun-so Lee, Dongsik Bang, Sungnack Lee. Behçet's disease-like symptoms induced by the Herpes simplex Virus in ICR mice. *Eur J Dermatol* 1:21-23.1998.
 11. 蔡仁植. 傷寒論譯註. 高文社 316, 413, 471.1991.
 12. S. Sohn, D. Bang, E-S. Lee, H. J. Kwon, S. I. Lee, and S. Lee. Experimental studies on the antiviral agent famciclovir in Behçet's disease symptoms in ICR mice. *British Journal of Dermatology* 145:799-804.2001.
 13. International Study Group for Behçet's disease(ISGBD). Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet* 335:1078-1080.1990.
 14. Hori Y, Miyazawa S, Nishiyama S, Miyata M, Ishikawa S. Experimental Behçet's disease and ultrastructural X-ray microanalysis of pathological tissues. *J Dermatol* 6:31-37.1979.
 15. Karaki S, Kariyone A, Kato N, Kano K, Iwakura Y, Takiguchi M. HLA-B51 transgenic mice as recipients for production of polymorphic HLA-A, B-specific antibodies. *Immunogenetics* 37:139-142.1993.
 16. Takeno M, Kariyone A, Yamashita N, Takiguchi M, Mizushima Y, Kaneoka H, Sakane T. Excessive function fo peripheral blood neutrophils from patients with Behçet's disease and from HLA-B51 transgenic mice. *Arthritis Rheum* 38:1298-1303.1995.
 17. Stanford MR, Kasp E, Wilson A, Hasan A, Todryk S, Shinnick T, Mizushima Y, Dumonde DC, van der Zee R, Lehner T. Heat shock protein peptides reactive in patients with Behçet's disease are uveitogenic in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 97:226-231.1994.
 18. Sohn S, Lee ES, Bang D, Lee S. Behçet's Disease-like Symptoms induced by Herpes Simplex Virus in ICR Mice. *Eur J Dermatol* 1:21-23.1998.
 19. 유금룡, 장규태, 김장현. 베체트병에 대한 동서의학적 고찰. 동국한의학회연구논문집 8(1):191-204.1999.
 20. 方清文. 當歸補血湯合甘草瀉心湯治療白塞綜合征32例. 新中醫 33(10):61-62.2001.
 21. 孫月霞, 吳桂林. 龍膽瀉肝湯治療狐惑病30例. 廣西中醫藥 24(2):37.2001.
 22. 孟輝, 張華. 內外合治法治療白塞氏病11例. 湖南中醫雜誌 17(4):40.2001.
 23. 손성향, 방동식, 이승임, 권혁재, 이은소, 김장현, 최서영, 이성낙. 베체트병 마우스 모델에서 증상의 호전에 대한 풀키친과 한약(가미청혈보혈탕 또는 가미용담사간탕)의 복합 투여효과. 대한한의학회지, 22(2):102-108.2001.
 24. 文濬典 等. 傷寒論精解. 317-320, 330-335.2003.
 25. 경희대학교 한의과대학 제49기 졸업준비위원회. 金匱要略湯證論治. 정담 515-519.2002.
 26. 손성향. 베체트의 병인. *Medical Postgraduates* 1(29):16-20.2001.
 27. 김하원. 면역학사전. 서울사립대학교출판부 133, 188.2001.
 28. Trinchieri G, Perussia B. Human natural killer cells : biologic and pathologic aspects. *Lab Invest* 50:489-513.1984.
 29. 김광혁 등. 세포 분자 면역학. 정문각 341.1998.
 30. Banchereau J. Interleukin-4. The cytokine Handbook. Thomson A, Academic Press 119.1991.
 31. 김세중. 면역학. 고려의학 156.1994.
 32. 하대유. 그림으로 본 면역학. 고문사 102-103.1994.
 33. Fujii, N., Minagawa, T., Nakane, A., Kato, F., Ohno, S. Spontaneous production fo gamma-interferon in cultures of T lymphocytes obtained from patients with Behçet's disease. *Journal of Immunology* 130:1683-1686.1983.
 34. Bacon, T.H., Ozbakir, F., Elms, C.A., Denman, A.M. Interferon-gamma rproduction by peripheral blood mononuclear cells from patients with Behçet's syndrome. *Clinical and Experimental Immunology* 57:541-547.1984.
 35. Kim MS, Kim SO, Lim WK, Lee JM, Hwang CY, Cho KH, Kim HM. Novel effects of On-Chung-Eum, the traditional plant medicine, on cytokine production in human mononuclear cells from Behçet's. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 25(1):65-75.2003.
 36. Hamazaoui K, Hamzaoui A, Guemira F, Bessioud M, Hamza M, Ayed K. Cytokine profile in Behçet's disease patients. Relationship with disease activity. *Scand J Rheumatol* 31(4):205-210.2002.
 37. Raziuddin S., al-Dalaan A., Bahabri S., Siraj AK., al-Sedairy S. Divergent cytokine production profile in Behçet's disease. Altered Th1/Th2 cell cytokine pattern. *J Rheumatol* 25(2):329-333.1998.
 38. Mi-Sun Kim, Hwan-Suck Chung, Jun-Gyoung Lee, Woon Ki Lim. Chung-Yeon Hwang, Eon-Jeong Lee, Kwang-Ho Cho, Dac-Han Wi, Hyung-Min Kim. Inhibition of cytokine production by the tradotional oriental medicine, 'Gamcho-Sasim-Tang' in mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells from Adamantiades-Behçet's patients. *Journal of Ethnopharmacology* 83:123-128.2002.
 39. Seonghyang Sohn, Eun-So Lee, Sungnack-Lee. The correlation of MHC haplotype and development of Behçet's disease-like symptoms induced by herpes simplex virus in several inbred mouse strains. *Journal of Dermatological Science* 26:173-181.2001.
 40. Seonghyung Sohn, Eun-So Lee, Hyuk Jae Kwon, Seung Ihm Lee, Dongsik Bang, Sungnack Lee. Expression of Th2 Cytokines Decreases the Development of and Improves Behçet's Disease-Like Symptoms Induced by Herpes Simplex Virus in Mice. *The Journal of Infection Diseases* 183:1180-1186.2001.